吡虫啉对意大利蜜蜂脑乙酰胆碱受体分布的影响

周 婷[1,2], 宋怀磊[1,2], 王 强[1,2], 代平礼[1,2], 吴艳艳[1,2], 孙继虎[3,*]
(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093; 2. 农业部授粉昆虫生物学重点开放实验室, 北京 100093
3. 第二军医大学生理学教研室, 上海 200433)

摘要: 蜜蜂是自然界主要的授粉昆虫; 新烟碱类杀虫剂(neonicotinoid insecticide)通过结合害虫体内乙酰胆碱受体(nAChR)使害虫致死, 是目前广泛用于田间害虫防控的杀虫剂。本研究以意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 和新烟碱类杀虫剂的代表品种吡虫啉为材料, 应用免疫组织化学的方法, 研究了正常成年蜜蜂脑内蘑菇体及视叶 nAChR-α7 的表达和分布; 分析了亚致死剂量新烟碱类杀虫剂吡虫啉对 nAChR-α7 表达和分布的影响。结果表明, nAChR-α7 在正常蜜蜂脑蘑菇体和视叶中均可检测到, 在蘑菇体中分布相对较少, 但在视叶分布丰富。吡虫啉对 nAChR-α7 在视叶的表达和分布有显著抑制作用, 但对蘑菇体 nAChR-α7 的表达没有显著影响。结果提示, 新烟碱类杀虫剂吡虫啉除了文献报道的抑制 nAChR 的表达外, 还能抑制 nAChR-α7 的表达量, 这是新烟碱类杀虫剂作用机制的新发现。

关键词: 意大利蜜蜂; 吡虫啉; 乙酰胆碱受体; 脑组织; 免疫组织化学
中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2013)11-1258-09

Effects of imidacloprid on the distribution of nicotine acetylcholine receptors in the brain of adult honeybee (*Apis mellifera ligustica*)

ZHOU Ting[1,2], SONG Huai-Lei[1,2], WANG Qiang[1,2], DAI Ping-Li[1,2], WU Yan-Yan[1,2], SUN Ji-Hu[3,*]
(1. Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China; 2. Key Laboratory of Pollinating Insect Biology, Ministry of Agriculture, Beijing 100093, China; 3. Department of Physiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Honeybees are the main pollinators in the nature. Currently neonicotinoid insecticides are widely used in the control of field pests in China due to its ability of binding to nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) and inducing pest death. Imidacloprid, a type of neonicotinoid insecticides, was used in this study to observe the distribution of nAChR-α7 in mushroom body and optic lobes in the brain of adult honeybee (*Apis mellifera ligustica*) with the immunohistochemical staining method. The results showed that nAChR-α7 was detected in the mushroom bodies and optic lobes of normal adult honeybees, with a stronger labeling in optic lobes. The feeding of sublethal doses of imidacloprid induced down-regulation of nAChR-α7 in the optic lobes but not in the mushroom bodies. The results indicate that in addition to the well-known inhibition of nAChR, the neonicotinoid insecticide imidacloprid can also suppress the expression of nAChR-α7. This finding might present a novel toxic mechanism of neonicotinoid insecticides in killing pests.

Key words: *Apis mellifera ligustica*; imidacloprid; nicotine acetylcholine receptor; brain tissue; immunohistochemical staining

新烟碱类杀虫剂(neonicotinoid insecticides)是全新结构的超高效杀虫剂, 它的成功开发是继拟除虫菊酯以来杀虫剂合成史上的又一重大突破(EFSA, 2013)。目前已成为继有机磷、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯之后销售量增加最快的第4类杀虫剂(谭成侠等, 2004; 杨吉春等, 2007), 这类农药对脊椎动物的作用较弱, 是取代那些对哺乳动物高毒、有残留和环境问题的有机磷、氨基甲酸酯类、拟除虫菊酯类、有机氯类杀虫剂的最佳品种之一。目前广泛应用于水稻、小麦、玉米、马铃薯、甜菜、

基金项目: 现代农业产业技术体系(蜜蜂)(CARS-45KXJ6)
作者简介: 周婷, 女, 1958年4月生, 江苏无锡人, 博士, 研究员, 研究方向为蜜蜂病理学, E-mail: ztapis@263.net
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: sunjihu@yeah.net
收稿日期 Received: 2013-03-15; 接受日期 Accepted: 2013-07-18

棉花、蔬菜等作物的害虫防治（Horowitz *et al*., 1998）。新烟碱类杀虫剂已有十几个产品商品化或即将商品化，其中吡虫啉连续几年成为全球销售额最大的杀虫剂，年销售额超过 10 亿美元。我国产业规模较大的有吡虫啉、啶虫脒、烯啶虫胺等。

乙酰胆碱是昆虫脑内重要的兴奋性神经递质。乙酰胆碱与烟碱型乙酰胆碱受体（nicotinic acetylcholine receptors, nAChR）α 型亚基上特异位点结合后，nAChR 的构象发生改变，离子通道打开。细胞膜内外 Na^+、K^+ 的离子浓度梯度导致 Na^+ 内流、K^+ 外流，细胞膜去极化，从而形成动作电位。研究表明，新烟碱类杀虫剂作为 nAChR 的激动剂（Nishimura *et al*., 1994；Zwart *et al*., 1994；Nagata *et al*., 1998），对昆虫的 nAChR 有高亲合力，能够与昆虫神经系统的烟碱型乙酰胆碱受体选择性地结合，但不被乙酰胆碱酯酶分解，导致昆虫的神经系统受过度刺激，最终致昆虫死亡。昆虫的乙酰胆碱受体与哺乳动物的乙酰胆碱受体的结构具有差异，新烟碱类杀虫剂对昆虫神经系统的烟碱型乙酰胆碱受体不仅显示了高选择性亲和力，而且还具有特殊的物理化学特性，例如非电离性和中等的水溶性等。这种差异导致新烟碱类杀虫剂对哺乳动物低毒但对许多类的昆虫表现出高毒作用（Millar and Denholm, 2007）。蜜蜂 nAChR 由 5 个亚基构成，其中包含 1 个 α7 亚基，根据文献报道（Kreissl and Bicker, 1989），α7 免疫组织化学染色阳性区域与 nAChR 在蜜蜂脑内的分布基本一致，本研究用 α7 抗体进行免疫组织化学染色，代表 nAChR 的分布。

蜜蜂是自然界主要的授粉昆虫，蜜蜂脑内包括蘑菇体和触角叶等部位有丰富的烟碱型乙酰胆碱受体的表达，如果烟碱类杀虫剂应用不合理，将影响蜜蜂的生存，进一步影响生态平衡。美国农业部的一项研究显示新烟碱类杀虫剂可能正在杀死全球蜜蜂。烟碱型乙酰胆碱受体作为新烟碱类杀虫剂的作用靶点，本实验研究了烟碱型乙酰胆碱受体的表达和分布特征，对于从细胞水平研究亚致死剂量烟碱类杀虫剂对蜜蜂神经系统的毒性作用，进一步阐明烟碱类杀虫剂对蜜蜂的毒性机理，从而改进害虫防治策略，合理使用杀虫剂具有重要意义。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　供试昆虫：出房 24 h 之内的成年意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 工蜂，取自中国农业科学院蜜蜂研究所蜜蜂保护和生物安全研究室实验蜂场。

1.1.2　供试药剂：0.6% 溴氰菊酯乳油制剂（江苏省宜兴市宜州化学制品有限公司）和 70% 吡虫啉水分散粒剂（美国百思特作物科学国际有限公司）。

1.1.3　主要仪器：Leica 冷冻切片机 CM 1900；Olympus 专业图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0。Nikon E600 荧光显微镜及 Nikon DXM1200 数字照相机（日本 Nikon 公司）。赛多利斯 TE64 分析天平（上海标仪仪器有限公司）

1.1.4　主要试剂：兔抗大鼠 nAChR-α7 多克隆抗体（北京博森生物技术有限公司）；辣根过氧化物酶山羊抗兔 IgG 抗体（北京博森生物技术有限公司）；免疫荧光染色试剂盒-羊抗兔 Cy3（碧云天生物技术研究所）；HRP 标记鼠抗 GAPDH 单克隆抗体（康成生物技术公司）。

1.2　蜜蜂吡虫啉处理

取 20.6326 g 70% 吡虫啉水分散粒剂与 1 L 50% 的蔗糖溶液充分混合，然后取 1 mL 该混合溶液加入 999 mL 50% 的蔗糖溶液中，取 29.535 mL 0.6% 溴氰菊酯乳油制剂与 1 L 50% 的蔗糖溶液充分混合，分别配制成吡虫啉蔗糖溶液（14.4428 mg/L）和溴氰菊酯蔗糖溶液（177.2098 mg/L）对蜜蜂进行饲喂，对照组饲喂 50% 蔗糖溶液。饲喂时间分别为 1 d 和 7 d；置于 35 ± 1℃，相对湿度 65% ~ 70% 之间的恒温培养箱内饲养。

1.3　免疫组化方法

将蜜蜂置于冰上冻晕，然后固定在 1 × PBS 中，在体视显微镜下，用游丝镊子迅速撕去蜜蜂头部几丁质外壳，然后剥离复眼及脑外层膜质，5 min 内取出蜜蜂脑。解剖出完整的脑和视叶，在 4℃ 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h，然后转入 4℃ 含 30% 蔗糖的磷酸缓冲液中脱水处理，用 OCT 将处理好的蜜蜂脑包埋，放入 −20℃ 冷冻切片机，15 min 后进行切片，切片厚度为 10 μm，0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液（pH 6.0）中，95℃ 水浴加热 20 min 左右，进行抗原修复；0.01 mol/L PBS（pH 7.4）漂洗 5 min × 3 次。兔抗大鼠 nAChR-α7 抗体按 1∶200（v/v）稀释后加入，使切片完全浸入抗体溶液中，室温孵育 18 h；0.01 mol/L PBS（pH 7.4）漂洗 5 min × 3 次，荧光标记的羊抗兔 Cy3 抗体按 1∶200（v/v）稀释后加入，使切片完全浸入此二抗溶液中，室温孵育 2 h；0.01 mol/L PBS（pH 7.4）漂洗 5 min × 3 次。将切片浸入 Hoechst 染液中染色 10 min；在 0.01 mol/L

PBS(pH 7.4)漂洗 5 min ×3 次。

1.4 荧光显微镜观察

切片采集 2 种荧光图像，将图像输入 Image-Pro Plus 6.0 软件，对 nAChR-α7 的免疫组化图片进行光密度(optical density, OD)测定；将所得光密度数据用 SAS 8.0 软件进行分析。不同样本的组织中光密度用单因变量多因素方差分析(univariate)、多重比较 LSD 检验进行两两比较，分析结果用平均值 ± 标准误(mean ± *SE*)表示。

2 结果

2.1 蜜蜂脑结构

蜜蜂脑由前脑(protocerebrum)、中脑(deutocerebrum)和后脑(tritocerebrum)3 部分组成(图 1：A)。其中前脑最大，包括左右两侧突出对称分布的视叶(optic lobe)、中部的一对蘑菇体(mushroom body，又称"蕈形体")以及蘑菇体中间的一个中心体(central body, CB)。视叶由视小叶(lobula, lo)、视髓层(medulla, me)和视叶神经节层(lamina ganglionaris, la)构成，视小叶和视髓层之间有内神经交叉(internal chiasma)相联系，视髓层和视神经节层之间有外神经交叉(external chiasma)相联系，视叶直接与复眼相连，由复眼发出的视神经纤维投射进入视叶神经节层。

蘑菇体是最重要的联络中心，与大多数昆虫一样，蜜蜂每个蘑菇体包括 2 个杯状的蕈体冠(calyx, C)、较狭长的蕈体柄(pedunculus, P)和分叉的蕈体根(root)(图 1：B)。蕈体冠可分为中间的 2 个中蕈体冠(middle calyx, mC)和两侧的侧蕈体冠(lateral calyx, lC)，中蕈体冠在脑中的位置较为靠前，而 2 个侧蕈体冠则较为靠后。蘑菇体内分布着密集排列的内源神经细胞，即肯扬细胞(Kenyon cell, kc)，这些细胞占据了蘑菇体的大部分髓区。按照细胞的大小、形状以及位置的不同，可将肯扬细胞分为内部致密细胞(inner compact cell, icc)、非致密细胞(noncompact cell, ncc)和外部致密细胞(outer compact cell, occ)等 3 类细胞。其中，内部致密细胞位于蕈体冠的中下部，圆锥形，细胞体较小；非致密细胞位于蕈体冠内部，环绕在致密细胞周围，细胞体较大；外部致密细胞分布在蕈体冠外侧，细胞体较小。蕈体冠内肯扬细胞的树突接受多种形式的感觉信息，然后通过轴突进入蕈体柄，末端神经纤维在蕈体柄的腹侧分叉，一支向上延伸为 α 叶(alpha lobe, α)，另一支延伸到中部，形成 β 叶(beta lobe, β)，二者接近垂直。蕈体冠上聚集了很多神经细胞球体，蕈体柄及蕈体根都是联络神经元的轴突和侧枝。

中心体位于前脑中部两蕈体柄基部之间，呈卵圆形(图 1：A)。侧前脑(lateral protocerebrum, LP)位于前脑的腹侧面，蕈体根的下方(图 1)。视叶是视觉中心，蘑菇体是最重要的联络中心，与复杂的学习和记忆行为密切相关。一般来说，工蜂的蘑菇体比雄蜂发达，而视叶没有雄蜂发达。前脑是一切活动及生长发育的控制协调中枢。

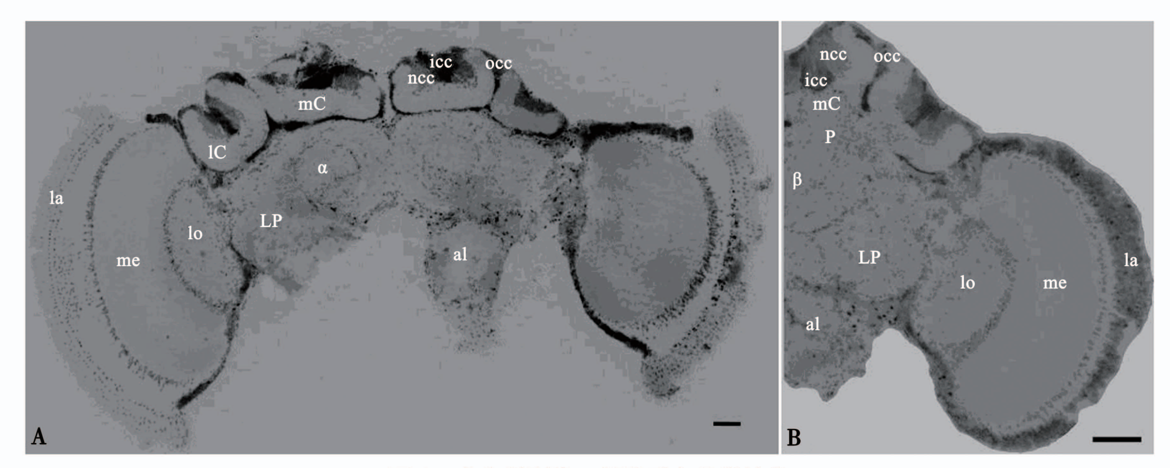


图 1 意大利蜜蜂工蜂脑形态显微结构

Fig. 1 Microstructure of brain of workers of *Apis mellifera ligustica*

A：脑 Brain；B：蘑菇体和视叶 Mushroom body and optic lobe. mC：中蕈体冠 Middle calyx；lC：侧蕈体冠 Lateral calyx；P：蕈体柄 Pedunculus；ncc：非致密细胞 Noncompact cell；icc：内部致密细胞 Inner compact cell；occ：外部致密细胞 Outer compact cell；LP：侧前脑 Lateral protocerebrum；α：α 叶 Alpha lobe；β：β 叶 Beta lobe；la：视神经节层 Lamina ganglionaris；me：视髓层 Medulla；lo：视小叶 Lobula；al：触角叶 Antennal lobes. 标尺 Scale bars = 100 μm.

中脑位于前脑之下，具有 2 个膨大的触角叶(antennal lobes，al)，是触角的神经中枢。触角叶又称嗅叶(olfactory lobe)，是触角神经(antennal nerve)细胞所在地(图 1)。后脑位于中脑之后，是脑的第 3 部分，很不发达，分为左右两叶，后脑发出的神经源自第 2 触角体节的神经节，发出运动神经元到上唇和咽，支配口道-前肠神经系统的活动。

2.2　吡虫啉、溴氰菊酯对蜜蜂脑内 nAChR-α7 表达和分布的影响

荧光免疫组化染色结果显示，nAChR-α7 在正常蜜蜂脑内的蘑菇体(图 2)和视叶(图 5)有表达，但 nAChR-α7 在蘑菇体的表达没有视叶显著。在蘑菇体，nAChR-α7 主要分布在蕈体冠和中心体，而在蕈体柄和蕈体根未见分布。

饲喂亚致死剂量溴氰菊酯和吡虫啉 1 d 和 7 d，蜜蜂脑蘑菇体的 nAChR-α7 的表达未见明显改变，图 3 和图 4 分别显示了饲喂亚致死剂量溴氰菊酯和吡虫啉 7 d 蘑菇体 nAChR-α7 的表达。通过计算并分析蘑菇体 nAChR-α7 染色图像的平均光密度，发现饲喂亚致死剂量溴氰菊酯和吡虫啉 1 d 和 7 d 与正常对照组之间均无显著差异($P>0.05$)(表 1)。

在视叶，饲喂亚致死剂量溴氰菊酯 1 d 以及 7 d 对 nAChR-α7 的表达也没有显著作用，图 6 显示了饲喂亚致死剂量溴氰菊酯 7 d 蜜蜂脑视叶 nAChR-α7 的表达，通过计算并分析平均光密度发现，溴氰菊酯处理组 1 d 和 7 d 与正常对照组之间的表达量没有显著差异($P>0.05$)。而饲喂亚致死剂量吡虫啉 1 d 和 7 d 后，蜜蜂脑视叶 nAChR-α7 的表达显著降低($P<0.05$)(表 1)，图 7 显示了吡虫啉处理后 7 d 蜜蜂脑视叶 nAChR-α7 的表达。

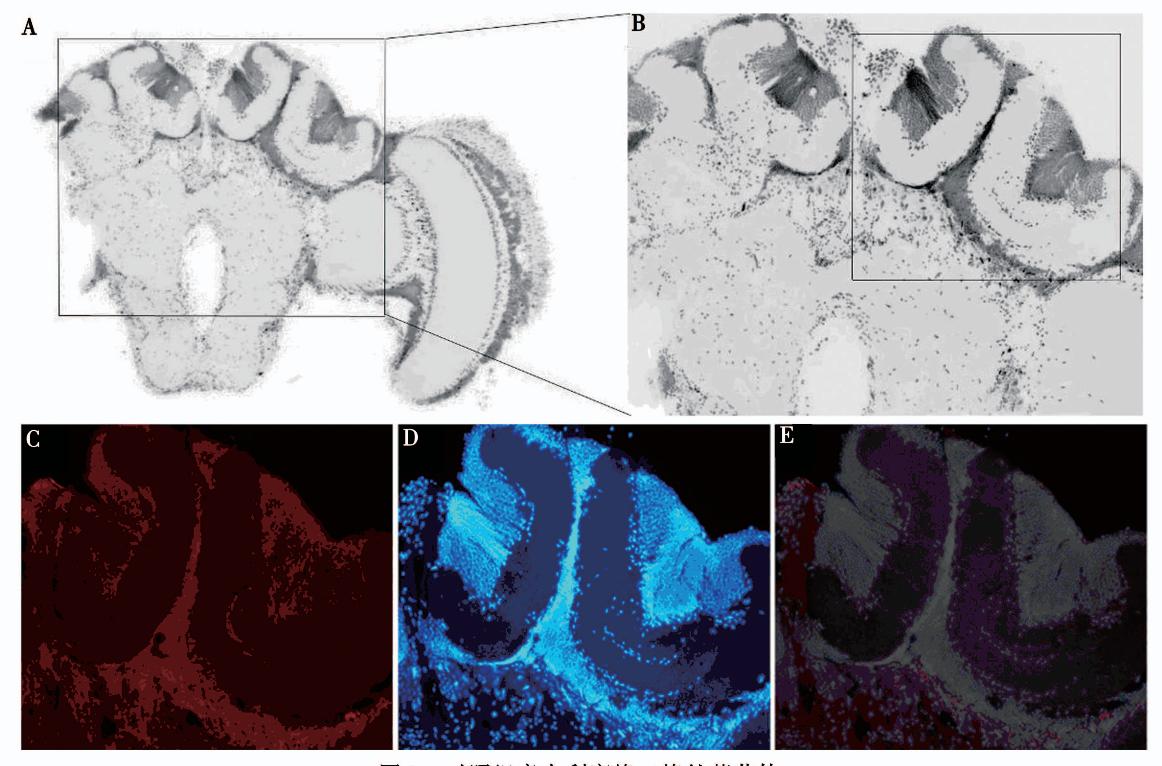


图 2　对照组意大利蜜蜂工蜂的蘑菇体

Fig. 2　Mushroom body of workers of *Apis mellifera ligustica* in blank control group

A：脑 Brain；B：A 图中方框标记部分的放大图像 Magnified view of the boxed area in figure A；C，D，E：B 图中方框标记部分的放大图像 Magnified views of the boxed area in figure B (C：nAChR-α7 的荧光染色图像 Fluorescence stained image of nAChR-α7 expression；D：DAPI 蓝色荧光核染图像 Chromosomal DNA counterstained with DAPI；E：C 和 D 的叠加图像 Overlapping images of C and D)．图 3 和 4 同 The same for Figs. 3 and 4.

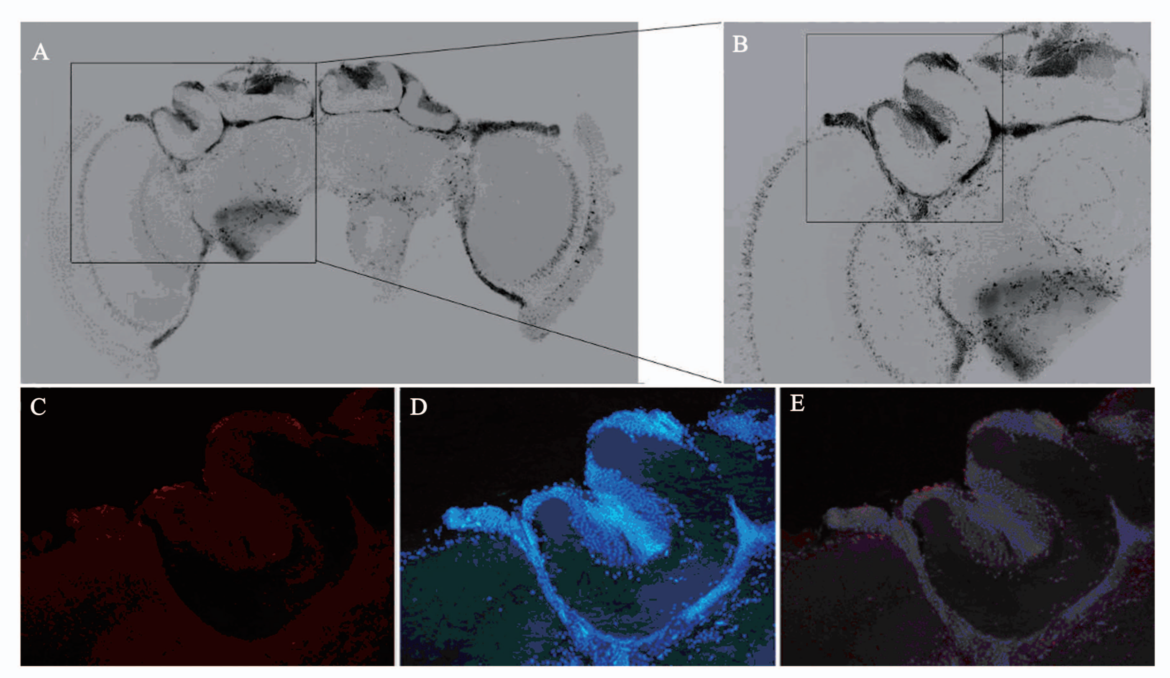


图 3 经亚致死剂量溴氰菊酯处理 7 d 的意大利蜜蜂工蜂的蘑菇体

Fig. 3 Mushroom body of workers of *Apis mellifera ligustica* treated by sublethal dose of deltamethrin for 7 d

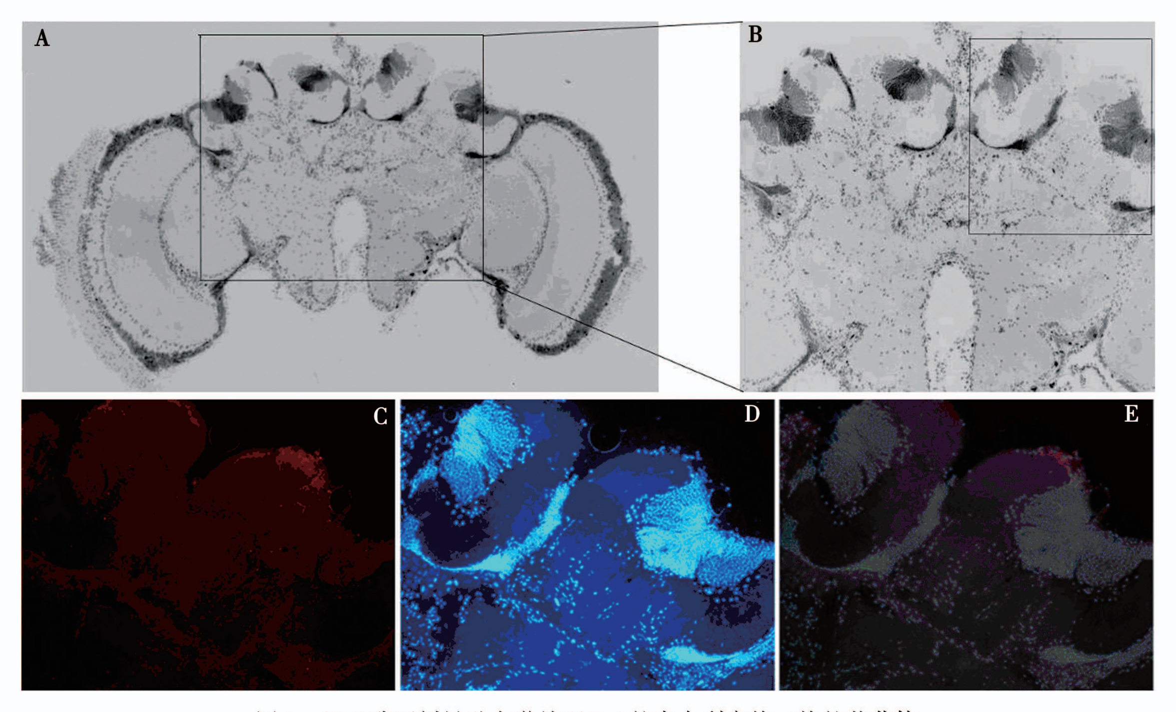


图 4 经亚致死剂量吡虫啉处理 7 d 的意大利蜜蜂工蜂的蘑菇体

Fig. 4 Mushroom body of workers of *Apis mellifera ligustica* treated by sublethal dose of imidacloprid for 7 d

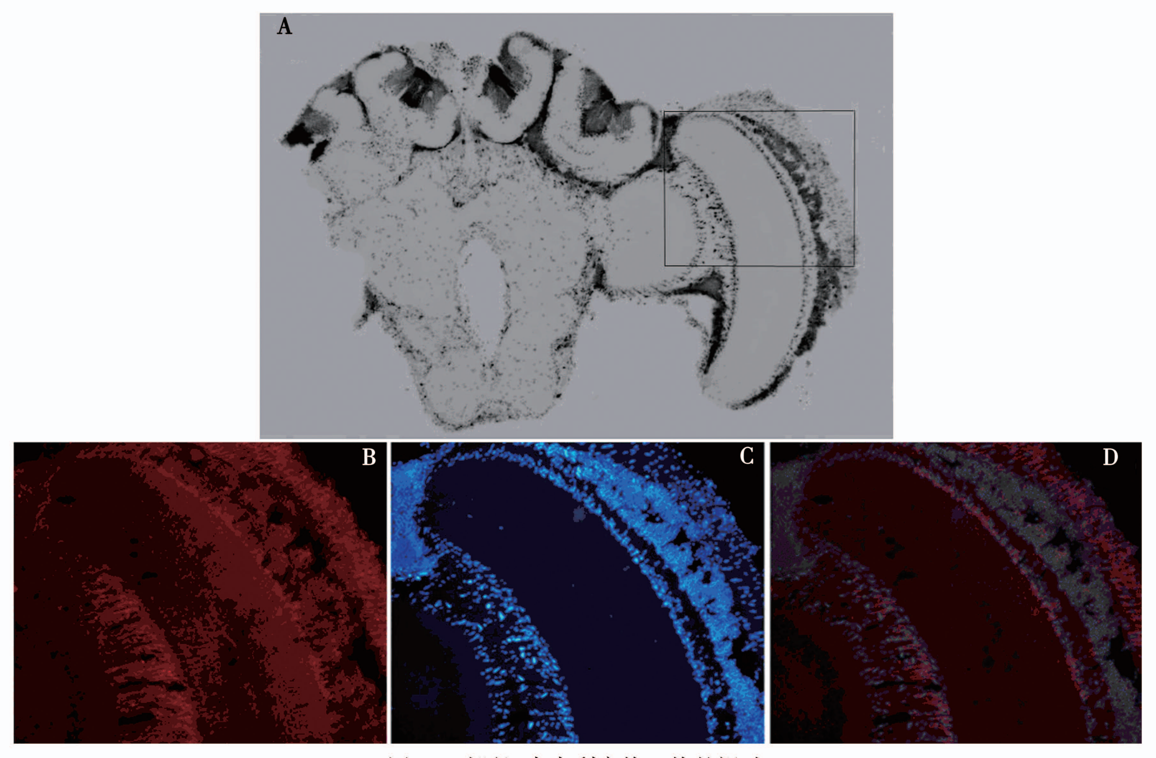


图 5　对照组意大利蜜蜂工蜂的视叶

Fig. 5　Optic lobe of workers of *Apis mellifera ligustica* in the control group

A：脑 Brain；B，C，D：A 图中方框标记部分的放大图像 Magnified views of the boxed area in figure A（B：nAChR-α7 的荧光染色图像 Fluorescence stained image of nAChR-α7 expression；C：DAPI 蓝色荧光核染图像 Chromosomal DNA counterstained with DAPI；D：B 和 C 的叠加图像 Overlapping images of B and C）. 图 6 和 7 同 The same for Figs. 6 and 7.

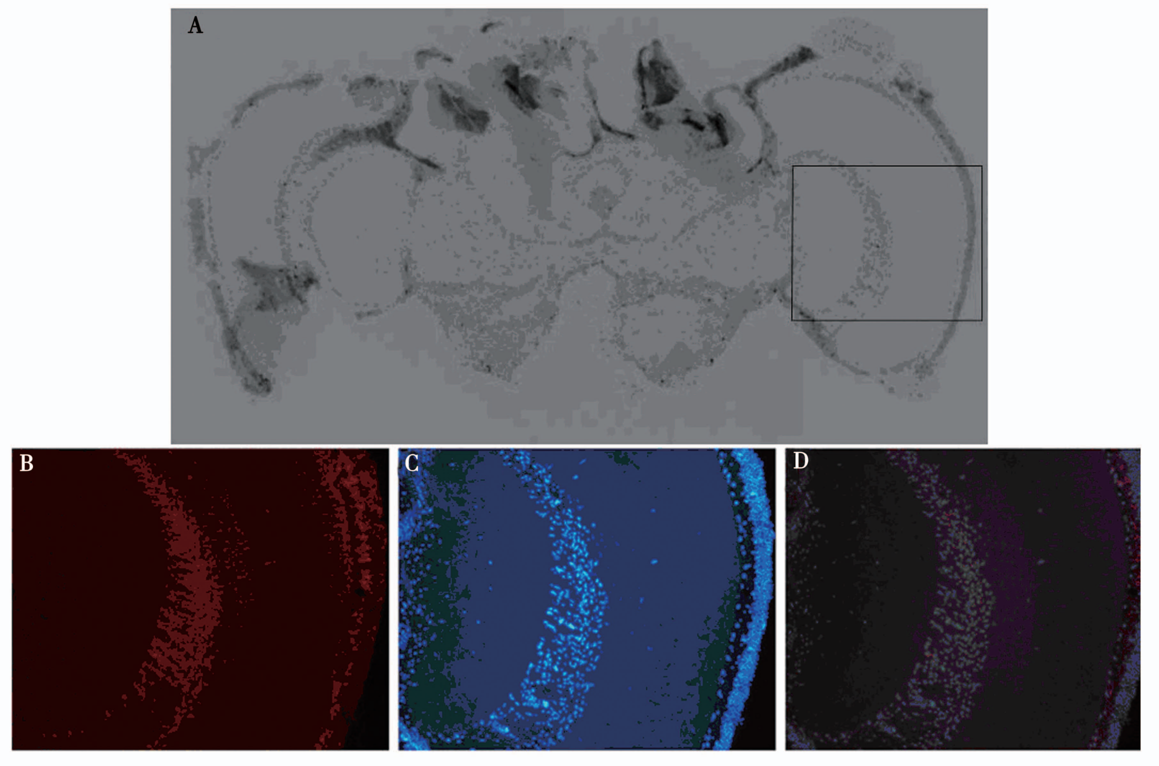


图 6　经亚致死剂量溴氰菊酯处理 7 d 的意大利蜜蜂工蜂视叶

Fig. 6　Optic lobe of workers of *Apis mellifera ligustica* treated by sublethal dose of deltamethrin for 7 d

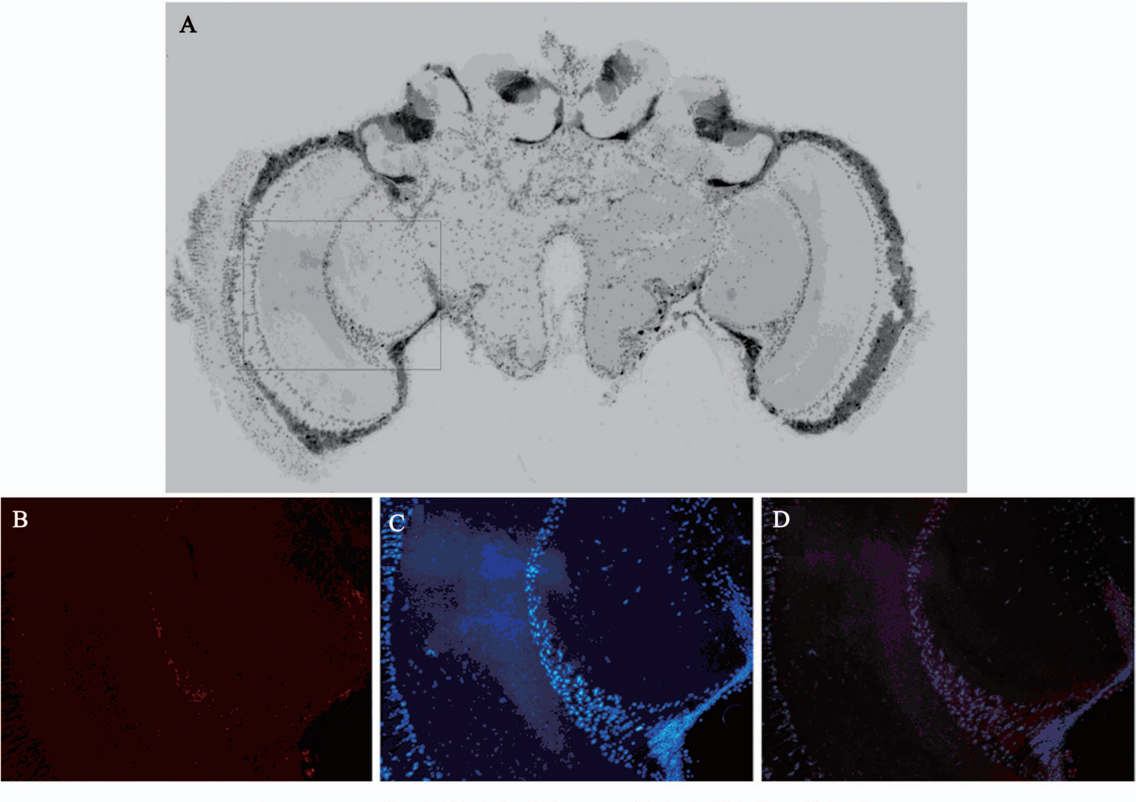


图 7 经亚致死剂量吡虫啉处理 7 d 的意大利蜜蜂工蜂视叶

Fig. 7 Optic lobe of workers of *Apis mellifera ligustica* treated by sublethal dose of imidacloprid for 7 d

表 1 不同处理意大利蜜蜂工蜂脑阳性表达组织的平均光密度

Table 1 The mean optical density of brain tissues of workers of *Apis mellifera ligustica* with different treatments

处理 Treatment	处理时间(d) Treatment time	蘑菇体 Mushroom body	视叶 Optic lobe
空白对照组	1	0.0317 ± 0.0021 a	0.0377 ± 0.0071 a
Blank control	7	0.0312 ± 0.0010 a	0.0366 ± 0.0071 a
溴氰菊酯	1	0.0315 ± 0.0011 a	0.0382 ± 0.0041 a
Deltamethrin	7	0.0304 ± 0.0011 a	0.0397 ± 0.0020 a
吡虫啉	1	0.0337 ± 0.0028 a	0.0260 ± 0.0019 b
Imidacloprid	7	0.0333 ± 0.0021 a	0.0249 ± 0.0026 b

同列数据标有不同字母的差异显著(单因变量多因素方差分析, $P<0.05$)。Data with different letters in the same column are significantly different at the 0.05 level (univariate test).

3 讨论

按照我国农药对蜜蜂的毒性等级划分标准，农药对蜜蜂的毒性可分为高毒(0.001 ~ 1.99 μg/蜂)、中毒(2.0 ~ 10.99 μg/蜂)和低毒(>11.0 μg/蜂)，研究发现溴氰菊酯对蜜蜂的毒性为中毒(代平礼等, 2007)，吡虫啉对蜜蜂的毒性为高毒(吴凌云等, 2005; 苍涛等, 2012)。而亚致死剂量作为一个剂量范围并没有一个确切的数值，不同的研究目的和不同的研究方法就有不相同的亚致死剂量(Lei and Liu; 1996; Pedersen *et al.*, 1997; Delpuech *et al.*, 1999)，本实验所用亚致死剂量均为试验所得的剂量浓度的 LC_5(代平礼等, 2007)。

溴氰菊酯属于拟除虫菊酯类杀虫剂，主要作用于昆虫的电压门控钠离子通道。神经生理学研究表明，拟除虫菊酯类杀虫剂的作用机制是干扰电压门控钠离子通道闸门的开闭，使得钠通道延迟关闭，从而引起持续性后放和突触传递的阻断(Salgado *et al.*, 1983; Soderlund and Bloomquist, 1989)，导致昆虫的神经和行为发生紊乱而运动失调(周婷等, 2003; 周婷等, 2008; Zhou *et al.*, 2011)。吡虫啉属于新烟碱类杀虫剂，其作用机理是通过结合昆虫的乙酰胆碱受体的 α 亚基而阻断神经递质乙酰胆碱与乙酰胆碱受体结合，从而使昆虫产生麻痹等症状。由于 2 种农药的作用机理不同，因此溴氰菊酯在本实验中作为阴性对照。本文的结果也表明，溴氰菊酯对蘑菇体和视叶 nAChR-α7 表达的影响均没有观察到统计学的差异，因此，溴氰菊酯在本实验作为阴性对照是合适的。

昆虫 nAChR 亚基分为 α 型亚基和 β 型亚基两种类型，其中 α 型亚基为功能亚基，能够结合神经递质乙酰胆碱，β 型亚基则为结构亚基，负责形成具有一定功能的受体结构。至今，意大利蜜蜂的脑中已经明确的 nAChR α 亚基有 4 个，即 Apisα2，Apisα3，Apisα7-1 和 Apisα7-2（Thany *et al*., 2005）。Dacher 等（2005）发现，昆虫 nAChR 有两种，其中含 α7 亚基的 nAChR 对阻断剂 α-Btx 敏感，不含 α7 亚基的 nAChR 对阻断剂 α-Btx 不敏感，但能够被美加明所抑制（Dacher *et al*., 2005），本文讨论的是对 α-Btx 敏感的也就是含有 α7 亚基的 nAChR。在哺乳动物中也存在两种类似的 nAChR 亚基，即 α-Btx 敏感的 α7 和 α-Btx 非敏感的 α4β2（Hogg *et al*., 2003）。

蜜蜂 nAChR 由 5 个亚基构成，其中包含 1 个 α7 亚基，理论上 5 个亚基都可以作为检测对象，但市面上并没有用于针对蜜蜂 nAChR 的相应抗体，通过比较蜜蜂与免疫组化中常用乙酰胆碱受体抗体来源动物的同源性高低，蜜蜂脑中的 α7 与哺乳动物的 α7 约有 40% 的同源性（Thany *et al*., 2005）。预实验证明本研究所使用的是抗鼠 α7 抗体，可以确切显示蜜蜂脑内 α7 的分布，以代表蜜蜂 nAChR 的表达和分布，最终确定以 α7 亚基作为检测对象。因此，本实验使用的是抗鼠 α7 抗体。本实验观察到的蜜蜂脑组织抗鼠 α7 抗体免疫组织化学染色阳性区域与文献报道的 nAChR 在蜜蜂脑内的分布基本一致（Kreissl and Bicker, 1989）。显示 α7 mRNA 表达的原位杂交染色结果表明，α7 在蜜蜂的蛹期没有表达，而在成年蜜蜂有表达（Thany *et al*., 2005），本研究所取的脑组织均来自成年蜜蜂，因此，抗鼠 α7 抗体可显示成年蜜蜂脑内 α-Btx 敏感的 nAChR 的表达和分布。

本研究应用免疫组织化学荧光染色的方法，主要观察了 nAChR-α7 在成年蜜蜂脑蘑菇体和视叶的表达分布情况以及杀虫剂对 nAChR-α7 在这两个部位的分布和表达的影响。我们的结果显示，nAChR-α7 在正常成年蜜蜂脑的蘑菇体和视叶中均有分布，但在蘑菇体中表达和分布相对较少。Thany 等（2005）研究表明，表达在蘑菇体细胞的 nAChR 的亚基主要为 α2，α8 和 β1，只有少量的细胞有 α7 亚基，本研究结果进一步表明蜜蜂蘑菇体含 α7 亚基的 nAChR 表达相对较低。相比蘑菇体，本研究观察到 nAChR-α7 在视叶上表达相对丰富，提示蘑菇体和视叶中 nAChR 组成的亚基可能不同，在视叶中 nAChR 含 α7 亚基较多。nAChR 的存在，再次证实蘑菇体和视叶作为昆虫脑的高级中枢和多种感觉信息的整合中心，参与调控昆虫学习和记忆的重要性。由于 nAChR 亚基组分的不同将导致不同亚基的 nAChR 受体与乙酰胆碱结合后产生的电生理反应不同（Dupuis *et al*., 2011），因此，本文的形态学的结果即蘑菇体和视叶 nAChR 的组分不同，提示 nAChR 的功能在这个部位将存在差异。

给予蜜蜂亚致死剂量拟除虫菊酯类杀虫剂溴氰菊酯饲喂 1 d 或 7 d 后，nAChR-α7 在蜜蜂脑内蘑菇体和视叶的表达和分布均未受到影响，而给予蜜蜂亚致死剂量新烟碱类杀虫剂吡虫啉饲喂 1 d 或 7 d 后，nAChR-α7 在蜜蜂脑内视叶的表达受到显著抑制作用。结果提示，新烟碱类杀虫剂吡虫啉不仅对 nAChR-α7 的功能有影响，而且对其表达量也有显著抑制作用，这是新烟碱类杀虫剂吡虫啉作用机制的新发现。

本研究给予蜜蜂饲喂亚致死剂量吡虫啉 1 d 和 7 d，蘑菇体 nAChR-α7 的平均光密度在实验组和正常对照组之间无显著差异，我们认为主要的原因可能是蘑菇体 nAChR-α7 表达不丰富，形态学变化的敏感性不足以观察到差异，而不能认为吡虫啉对蘑菇体 nAChR-α7 的表达量没有影响，因为在视叶，饲喂亚致死剂量吡虫啉 1 d 和 7 d 后，nAChR-α7 的表达量显著降低。

亚致死剂量溴氰菊酯能够导致蜜蜂工蜂的嗅觉敏感性大大降低（宋怀磊等，2011），但对蜜蜂工蜂脑中 nAChR-α7 的表达量并没有显著影响，而亚致死剂量吡虫啉能够抑制蜜蜂工蜂脑，尤其是视叶中的 nAChR-α7 的表达量，但对蜜蜂工蜂的嗅觉敏感性没有显著影响，由此可以推测，蜜蜂嗅觉的发生过程与 nAChR-α7 并没有直接关系。

致谢　本研究的免疫组织化学实验在第二军医大学神经生物教研室完成，得到了向正华教授的指导，在此致谢。

参考文献（References）

Cang T, Wang YH, Yu RX, Wu CX, Chen LP, Wu SG, Zhao XP, 2012. The acute toxicity and risk assessment of 25 pesticides used in nectar plant to *Apis mellifera* L. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 24(5): 853－859.［苍涛，王彦华，俞瑞鲜，吴长兴，陈丽萍，吴声敢，赵学平，2012. 蜜源植物常用农药对蜜蜂急性毒性及风险评价. 浙江农业学报，24(5)：853－859］

Dacher M, Lagarrigue A, Gauthier M, 2005. Antennal tactile learning in

the honeybee: effect of nicotinic antagonists on memory dynamics. *Neuroscience*, 130: 37 –50.

Dai PL, Wang Q, Sun JH, Zhou T, Liu F, Wang X, 2007. Bioassay of four pesticides on *Apis mellifera*. *Agrochemicals*, 46(8): 546 –547. [代平礼, 王强, 孙继虎, 周婷, 刘锋, 王星, 2007. 4 种农药对意大利蜜蜂的毒力测定. 农药, 46(8): 546 –547]

Delpuech JM, Legallet B, Terrier O, Fouillet P, 1999. Modifications of the sex pheromonal communication of *Trichogramma brassicae* by a sublethal dose of deltamethrin. *Chemosphere*, 38: 729 –739

Dupuis JP, Gauthier M, Raymond-Delpech V, 2011. Expression patterns of nicotinic subunits α2, α7, α8, and β1 affect the kinetics and pharmacology of ACh-induced currents in adult bee olfactory neuropiles. *J. Neurophysiol.*, 106: 1604 –1613.

European Food Safety Authority, 2013. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance imidacloprid. *EFSA Journal*, 11(1): 3068.

Hogg RC, Raggenbass M, Bertrand D, 2003. Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 147: 1 –46.

Horowitz AR, Mendelson Z, Weintraub PG, Ishaaya I, 1998. Comparative toxicity of foliar and systemic applications of acetamiprid and imidacloprid against the cotton whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera Aleyrodidae). *Bull. Entomol. Res.*, 88: 473 –442.

Kreissl S, Bicker G, 1989. Histochemistry of acetylcholinesterase and immunocytochemistry of an acetylcholine receptor-like antigen in the brain of the honeybee. *Journal of Comparative Neurology*, 286: 71 –84.

Lei L, Liu L, 1996. Study on features of sublethal damage to *Bacillus anthracis* spores caused by chemical disinfectants. *Veteri. Sci. Technol.*, 26(6): 27 –29.

Millar NS, Denholm I, 2007. Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invert Neurosci.*, 7: 53 –66.

Nagata K, Iwanaga Y, Shono T, Narahashi T, 1998. Modulation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor channel by imidacloprid and cartap. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 59: 119 –128.

Nishimura K, Kanda Y, Okazawa A, Ueno T, 1994. Relationship between insecticidal and neurophysiological activities of imidacloprid and related compounds. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 50: 51 –59.

Pedersen A, John D, Gauthier D, 1997. Sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* on the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Entomol. Exp. Appl.*, 83: 253 –262

Salgado VL, Irving SN, Miller TA, 1983. The importance of nerve terminal depolarization in pyrethroid poisoning of insects. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 20: 169 –182.

Soderlund DM, Bloomquist JR, 1989. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Ann. Rev. Entomol.*, 34: 77 –97.

Song HL, Zhou T, Wang Q, Dai PL, Luo QH, Xu SF, Wu YY, 2011. Effects of sublethal doses of insecticides on the olfactory sensitivity of the honeybee (*Apis mellifera ligustica*). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(3): 611 –615. [宋怀磊, 周婷, 王强, 代平礼, 罗其花, 徐书法, 吴艳艳, 2011. 亚致死剂量杀虫剂对意蜂工蜂嗅觉敏感性的影响. 应用昆虫学报, 48(3): 611 –615]

Tan CX, Shen DL, Weng JQ, Fan DF, 2004. Research advances of modern insecticides. *Henan Chemical Industry*, (6): 7 –9. [谭成侠, 沈德隆, 翁建全, 樊德方, 2004. 近代杀虫剂的研究进展. 河南化工, (6): 7 –9]

Thany SH, Crozatier M, Raymond-Delpech V, Gauthier M, Lenaers G, 2005. *Apis* alpha2, *Apis* alpha7-1 and *Apis* alpha7-2: three new neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits in the honeybee brain. *Gene*, 344: 125 –132.

Wu LY, Li XF, Qiu LH, Zheng MQ, Tao CJ, Jiang H, Wang CJ, 2005. Acute toxicity of several kinds of preparation of imidacloprid and acetamiprid. In: Proceedings of International Symposium on Pesticide and Environmental Safety. China Agricultural University Press, Beijing. 166 –169. [吴凌云, 李学锋, 邱立红, 郑明奇, 陶传江, 姜辉, 王成菊, 2005. 几种吡虫啉和啶虫脒制剂对蜜蜂的急性毒性. 见: 农药与环境安全国际会议论文集. 北京: 中国农业大学出版社. 166 –169]

Yang JC, Li M, Chai BS, Liu CL, 2007. Recent research advances in new neonicotinoids insecticides. *Agrochemicals*, 46(7): 433 –438. [杨吉春, 李淼, 柴宝山, 刘长令, 2007. 新烟碱类杀虫剂最新研究进展. 农药, 46(7): 433 –438]

Zhou T, Wang Q, Dai PL, Zhang YL, Sun JH, 2008. Primary culture and electrophysiological properties of brain neurons of adult *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomologica Sinica*, 51(7): 700 –706. [周婷, 王强, 代平礼, 张毅力, 孙继虎, 2008. 成年蜜蜂脑神经细胞的培养和电生理特征. 昆虫学报, 51(7): 700 –706]

Zhou T, Wang Q, Yao J, 2003. Advances in research of fluvalinate resistance in *Varroa destructor*: sodium channels involved. *Entomological Knowledge*, 40(6): 491 –495. [周婷, 王强, 姚军, 2003. 钠离子通道与蜜蜂狄斯瓦螨对氟胺氰菊酯的抗性机理. 昆虫知识, 40(6): 491 –495]

Zhou T, Zhou W, Wang Q, Dai PL, Liu F, Zhang YL, Sun JH, 2011. Effect of sublethal doses pyrethroids on neuronal excitability of adult honey bees *Apis mellifera*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 100(1): 35 –40.

Zwart R, Oortgiesen M, Vijverberg HPM, 1994. Nitromethylene heterocycles: selective agonists of nicotinic receptors in locust neurons compared to mouse N1E-115 and BC3H1 cells. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 48: 202 –213.

(责任编辑: 赵利辉)